



TITLE:

蛋白のスルフヒドリル基の一定量法

AUTHOR(S):

森, 茂樹

CITATION:

森, 茂樹. 蛋白のスルフヒドリル基の一定量法. 化学研究所講演集 1941, 12: 123-130

ISSUE DATE:

1941-12-30

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/73707>

RIGHT:

蛋白のスルフヒドリル基の一定量法

森 茂 樹

A 緒 言

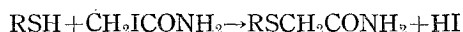
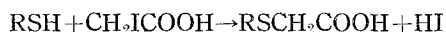
蛋白のスルフヒドリル基は言ふまでもなくその Cysteine 基に由來するものである。Cysteine が酸化して Cystine になるとときには S の結合に關して $2SH \rightarrow S-S$ なる反應が起ることはよく知られて居る事柄である。この反應は生體内に於て可逆的に進行して生じ酸化還元に關與する重要な反應であることは Hopkins の研究により明かであるのみならず Insulin, Flavin-enzyme, Urease, Papain, Cerebrosidase 及び Lipase 等の酵素又は類似の生體觸媒物質の活性基が $-SH$ 又は $-S-S-$ 基である⁽¹⁾ ことはよく知られたる著明の事實である。更に又筋肉蛋白がその收縮、伸長等による構造變化の場合にも、これらの基が關係して居ると言はれて居る。以上の如き事實の外に、一般蛋白の變性の問題等と關聯し蛋白の SH 基の重要性が近年特に注意せられる様になり、之が定量法が數多く提案せられつゝある。

夫等の中で從來普通に行はれて居る Cysteine (又は Cystine) の定量法は總べて蛋白の加水分解液中の Cysteine を定量する方法で或ひは沃度滴定法²⁾ により、或ひは 1—2 Naphthoquinone-4 Sodium sulfonate,³⁾ 又は Phosphotungstic acid⁽⁴⁾ 等による呈色を利用した比色による方法である。これらの方法は蛋白に含まれる Cystine 及び Cysteine の總和を求めらるためには都合がよいが蛋白の SH 又は S-S 基を別個に定量することは出来ない。その様な目的の爲に Mirsky 及び Anson⁽⁵⁾ 等は豫め蛋白を適當なる酸化劑 (H_2O_2 , Ferricyanide, Cystine 等) を用ひて SH 基を酸化し、又は沃度醋酸を用ひて SH 基に醋酸基を置換したる後、加水分解して Cysteine を定量し、一方斯様な處理を行はない蛋白の Cysteine 量との差を求めて SH 量を算出する方法を提案した。その方法によつて氏等は諸種の蛋白の變性時に於ける SH 又は S-S 基の増減を綿密に定量して居るが、その操作は相當に繁雜で特別の注意を拂はなければ十分なる結果を期待出来ない。

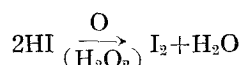
加水分解を行はず、直接蛋白に就てその SH 基を定量する方法には特殊の酸化性色素を以て滴定する方法即ち Todrick & Walker⁽⁶⁾ の 2-6 Dichlorophenolindophenol 法、Kuhn u. Desnuelle⁽⁷⁾ の Porphyrindin 法、或ひは Polarograph⁽⁸⁾ 法及び Mirsky & Anson⁽⁹⁾ 等の Ferricyanide 法、或ひは所謂直接法 (蛋白の SH を Cystine にて酸化し還元せられたる

Cysteine を比色により定量す) 等がある。以上の方法の中で Indophenol 滴定法は反應完結に加熱する必要があり、長時間を要し且反應終止點が不鮮明であるから良法とは言ひ難い。又 Porphyrindin 滴定法は常溫にて短時間のうちに滴定し得て簡易且つ正確な方法であるが、反應溶液の水素イオン濃度の限界が PH 7 附近に限られて居る不便がある。

近年 SH 基と沃度醋酸 (又は沃度醋酸アミド) との反應が迅速且つ定量的に進行することを利用し Mirsky & Anson 等は之を變性現象の研究に資せんとして居る。この反應は下式の如く進行するもので反應の條件 (溫度, 時間其他) に就ては既に Smithe⁽¹⁰⁾ 及び Dickens⁽¹¹⁾ 等が夫々 Cysteine, Glutathione 及び其他の SH- 化合物につき Warburg の裝置を用ひ Gas Manometric method により精密なる實驗結果を示して居る。



上掲の反應に於て發生した HI を酸化して沃度を游離せしめ之に澱粉を加へて生ずる青色相を比色して定量を行ふことも出来るわけである。



即ち斯くして生成した I₂ の量より下式により Cysteine 量を算出することが出来る。

$$\text{mgI} \times \frac{\text{mol. wt. Cysteine}}{\text{mol. wt. Iodine}} \times \frac{100}{\text{mg Protein}} = \% \text{Cysteine}$$

既にこの方法により最近 Rosner⁽¹²⁾ は卵 Albumin に就て行つた實驗結果を發表して居るが筆者は更にこの方法に就て定量の條件を詳しく吟味した。その結果を報告する次第である。

B 實 驗 成 績

1 定 量 法

蛋白又は SH 化合物に沃度醋酸アミドを一定條件の下にて反應せしめ、反應完結後生成せる沃化水素を過酸化水素にて分解し、游離した沃度に澱粉液を加へて呈する青色相を Cysteine 又は沃度の標準液と對照して比色する。

2 試 藥

(a) 沃度醋酸及び沃度醋酸アミド: 實驗に供用した沃度醋酸⁽¹³⁾ は市販モノクロル醋酸より合成したもので精製物の融點は 83°C, 使用に際し豫めフェノールレッドを指示藥として苛性アルカリを以て中和して用ひた。又沃度醋酸アミド⁽¹⁴⁾ は豫め合成した鹽化醋酸アミドを沃化加里にて置換して合成したもので精製品の融點 95°C, 使用に當り兩者何れも 0.1M 溶液を用ひた。

(b) 0.001 n 沃度溶液：

(c) 0.1% Cysteine 溶液：市販品又は特に調製せる Cysteine 0.1g を秤量し、水を加へて 100cc となし、更に使用の都度、沃度滴定⁽¹⁵⁾により厳密に濃度を検定して用ひた。實際には Cysteine が酸化して居るために Cysteine 含量は秤量による計算量よりも遙かに少いのが普通である。

(d) 1%澱粉溶液：澱粉 1 g に水 100cc を加へ 2—3 分間煮沸し、暫時静置の後、上澄液を濾紙パルプ層を通じ濾過した。

(e) 三鹽化醋酸液：三鹽化醋酸と同量の水を加へて溶解したもの。

(f) 3%過酸化水素：

(g) 濃硫酸：

沃度醋酸及び沃度醋酸アミド溶液の安定度：沃度醋酸は沃度醋酸アミドより少しく不安定であるがその 0.1 M 溶液は室温暗所に貯へた場合兩者何れも少くとも數日間は安定である。試薬の分解は沃度の游離することにより容易に檢識し得る。磷酸、硫酸、硼酸及び夫等の鹽類、稀薄アルカリ及び尿素等の溶液内に於ても安定であるが、濃厚なるハロゲン鹽及びハロゲン酸中に於ては徐々に分解し、濃度高きに從つて分解が著しい。試薬の安定性と反應時間の短きことの利點により以下の實驗に於ては概ね沃度醋酸アミドのみを用ひた。

(3) Cysteine と沃度醋酸アミドとの反應

Cysteine と沃度醋酸又は沃度醋酸アミドとの反應を完全に進行せしめるためには反應の溫度、時間及び水素イオン濃度を適當に調整することを要する。反應完結の所要時間は Smithe⁽¹⁶⁾によれば沃度醋酸アミドの方が沃度醋酸よりも速かであるが、何れにしても反應は極めて短時間に進行し 38°C に於ては數分間にて完結する。強いアルカリ側では、Cysteine が酸化を受けることが著しいから操作上特に注意を要するが PH 6—9 の廣い範圍に於て都合よく反應する。

前述の如く反應の完結を待ち發生した沃化水素を過酸化水素及び醋酸を加へて分解し、生成する沃度に澱粉液を加へ發色する青色相を比色定量するのであるが過酸化水素による沃化水素の分解時間（即ち發色時間）は添加する過酸化水素及び硫酸の量及び溫度によつても多少遲速がある。

今、下の如き溶液の組合せを以て Cysteine と沃度醋酸アミドとを 20°C に於て夫々 15, 30, 60分間反應せしめ、次に之に 3%の過酸化水素、濃硫酸各 0.1cc 及び 1%の澱粉溶液 1cc を夫々加へ、各一定時間毎に呈色度の増加を比較したる結果は第 1 表の如くである。即ち斯様な條件に於て Cysteine と沃度醋酸アミドとの反應時間が 30分に達すれば沃度の發色は 1 時間以

内に於て最高の一定値に達する。

反應溶液	0.061% Cysteine	0.5 cc
	0.1M Iodoacetamide	2.0 „
	Phosphate buffer, PH 7.0	7.5 „

第 1 表 單位 mg Iodine

Cysteine, Iodoacetamide との反應時間 min.	H ₂ O ₂ , H ₂ SO ₄ 添加後經過時間 min.					
	0	15	30	45	60	120
直 後	—	—	—	+	0.064	0.210
15	0.060	0.141	0.211	僅かに發色	0.264	0.320
30	0.159	0.231	0.282	0.320	0.320	0.320
60	0.180	0.231	0.320	0.320	0.320	0.320

(a) Cysteine 量と呈色度との比例關係

次に下記の如き溶液の組合せを以て 20°C に於て Cysteine と沃度醋酸アミドとを30分間反應せしめ、次に 3% H₂O₂, conc. H₂SO₄ 各 0.05cc 及び 1% 澱粉液を加へて一定時間毎に呈色度を比較した。その結果は第2表の如くで約 1 時間にて呈色度は一定値に達し且つ Cysteine 量とよく比例し沃度の定量値も亦計算値とよく合致する。

反應溶液	0.0524% Cysteine	0.1—0.5 cc
	0.1M Iodoacetamide	2 „
	Phosphate buffer, PH7.0	5 „
	Water	2.9—2.5 „

第 2 表 單位 mg Iodine

0.0524% Cysteine	min.	10	20	30	40	60	計算値
cc							
0.1		0.044	0.050	0.052	0.055	0.055	0.055
0.2		0.061	0.091	0.100	0.100	0.100	0.110
0.3		0.100	0.122	0.147	0.159	0.167	0.165
0.4		0.110	0.157	0.183	0.211	0.220	0.220
0.5		0.137	0.220	0.244	0.262	0.275	0.275

(b) Cysteine 以外のアミノ酸と沃度醋酸アミドとの反應

沃度醋酸又は沃度醋酸アミドは後述の如く Cysteine 以外のアミノ酸とも反應することが知られて居る。主として問題となるアミノ酸は Tyrosine, Tryptophane 及び Glycine 等であり、その反應を支配する直接の條件は水素イオン濃度である。依つて夫等のアミノ酸を PH 3~10の間に於て反應せしめ之を Cysteine の呈色度と比較して見た。その結果は第3表の如く

である。

反応溶液	0.05% Amino acid	0.5	cc
	0.1M Iodoacetamide	2	„
	Buffer Solution	5	„

第 3 表 単位 mg Iodine

Amino acid	PH	Acetate	luffer	Phosphate buffer			Borate buffer		
		3.1	4.9	5.6	6.3	7.3	8.6	9.5	10.0
Cysteine		—	—	0.255	0.260	0.260	0.260	0.257	0.255
Tyrosine		—	—	—	—	—	—	+	0.109
Tryptophane		—	—	—	—	—	—	+	0.075
Glycine		—	—	—	—	—	—	+	0.133
Glutamic acid		—	—	—	—	—	—	+	0.085

この結果に於て明かなる如く PH 9.5 以下に於ては Cysteine 以外のアミノ酸と沃度醋酸アミドとの反応は實際上無視して差し支へない。尚ほこの実験結果の如く Cysteine の発色は PH 5.5~9.5 の廣い範圍に於て一定して計算値と合致する。但し PH 9.5, 10 に於て少しく小なる値を示すのは強いアルカリ側に於て Cysteine の一部分が酸化したものと考へられる。

(4) 尿素變性卵 Albumin と沃度醋酸アミドとの反應

以上の如く沃度醋酸アミドと Cysteine に就て行つた實驗に基づき次に蛋白について卵 Albumin を例に採り尿素により變性せしめて發現した SH 量を次の如き條件の下にて定量した。

卵 Albumin は新鮮なる雞卵白より透折法¹⁷⁾により精製したもので、檢液は卵 Albumin 水溶液に結晶尿素を加へて飽和せしめ (檢液 1cc 中尿素約 17 mM を溶解す) 一定容とした。

沃度醋酸アミドと蛋白との反應完結に要する時間は Cysteine 其他簡單なる SH 化合物との反應に要する時間よりは幾分長いけれども常溫に於て30分にて充分であり、反應終結後過酸化水素による沃化水素の分解即ち沃度の呈色に要する處理條件は前掲 Cysteine の場合と同様で差支へない。唯蛋白の場合は反應完結を待ち三鹽化醋酸を加へて蛋白を除去し、その濾液に澱粉液を加へて呈色せしめる。

(a) 蛋白量と呈色度との比例關係

蛋白量と呈色度とがよく比例することは第 4 表の結果の通りである。

反應溶液:	卵 Albumin 尿素溶液 (1cc=1.8mg Albumin)	3—10	cc
	磷酸緩衝液 (PH 7.2)	2	„
	0.1M 沃度醋酸アミド	2	„

尿素を飽和せしめ更に飽和尿素溶液を加へ全容を各 20cc とす.

第 4 表

Albumin 溶 液 cc.	Iodine mg	Cysteine mg
3	0.057	0.054
4	0.077	0.073
5	0.093	0.089
6	0.115	0.110
7	0.133	0.127
8	0.153	0.146
9	0.172	0.164
10	0.192	0.183

(b) SH の發現に對する PH の影響

PH の變化により蛋白の SH 基の發現が増減することは Mirsky 等が筋肉蛋白について發見した所であるが尿素變性卵 Albumin に於ても第 5 表に示すが如く同様の傾向が見出される.

反應溶液: 卵 Albumin 尿素溶液 (1cc=1.56mg Albumin)	5	cc
0.1M 沃度醋酸アミド	2	„
緩 衝 液	5	„

尿素 12 g 及び飽和尿素溶液を加へ全容を 20cc とす.

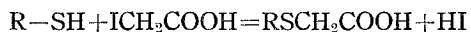
第 5 表

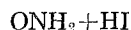
PH	緩 衝 液	Iodine mg	Cysteine mg	Cysteine %
3.1	醋 酸 鹽	0.053	0.051	0.65
4.5		0.063	0.063	0.81
5.5		0.077	0.073	0.94
6.5	燐 酸 鹽	0.081	0.077	0.99
7.0		0.084	0.080	1.02
7.7		0.084	0.080	1.02
8.6	硼 酸 鹽	0.086	0.082	1.05
9.5		0.094	0.089	1.11
10.4		0.099	—	—

第 5 表を圖示すれば第 1 圖の如くである.

C 考 察

Cysteine のみならず簡單なるスルフヒドリル化合物は沃度醋酸又は沃度醋酸アミドと下式の如く反應し短時間に定量的に完結する.

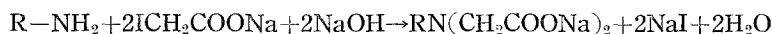




而してこの反應は蛋白の SH 基にも比較的短時間に同様に反應する。

蛋白の SH 定量にこの反應を應用するためには Cysteine 基のみがこれらの試薬と定量的に反應し其他種々なるアミノ酸基はこれと全く關係のないことが必要である。而し乍ら事實は然らずして數種のアミノ酸即ち Tyrosine, Tryptop-

hane, Histidine 及び Glycine 等⁽¹⁸⁾は沃度醋酸と反應することが知られて居る。但しその反應は中性溶液に於ては殆ど進行せず、強いアルカリ側に於てのみ下式の如くアミノ酸のアミノ基と醋酸基との間に起る⁽¹⁹⁾ものである。



而し乍ら第3表の實驗結果により明かなる如く Tyrosine, Tryptophane, Glycine 及び Glutamic acid 等のアミノ酸は PH 10 以下に於ては沃度醋酸との反應は極めて微弱で實際上無視して差支へない程度のものである。故にこの定量法は PH 10 以下の水素イオン濃度の廣い範圍に於て應用し得るものである。

卵 Albumin 尿素溶液の PH の變移に従つて發現する SH 量は第5表の如く Albumin の等電點の近くより急に増加し PH 8 附近までは大略一定値を保ち、それより次第に増加して行く。但し PH 10を越えたときの値は Cysteine 以外のアミノ酸基の影響のあることは第3表の結果により明かで直ちに SH 量として算出することは出来ない。

以上の方法によつて定量した値を今比較のために同じく尿素變性卵 Albumin に就て求められた他の實驗者の數値と比較して見ると第6表の様になる。

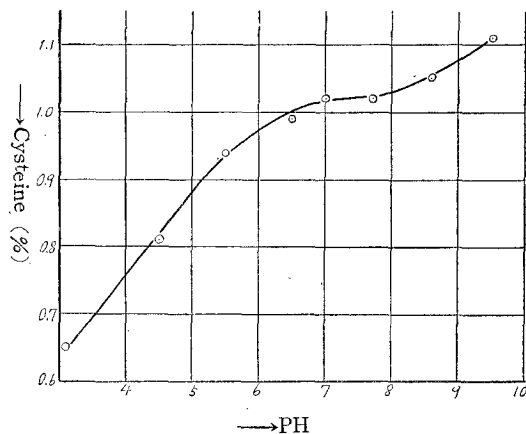
第 6 表

實 驗 者	Cysteine %
J. P. Greenstein ⁽²⁰⁾	1.00
L. Rosner ⁽²¹⁾	0.87
筆 者	0.99—1.02

D 要 旨

1. Cysteine と沃度醋酸アミドとの反應の條件を吟味し、反應の結果生ずる沃度の量が計算

第 1 圖



量と合致することを確めた。

2. Cysteine と沃度醋酸アミドとの反應を延長し、蛋白の SH 量を定量することの可能なことを確め且つ應用し得べき PH の限界を定めた。

終りに臨み本研究を行ふに當り御懇篤なる御指導を賜りたる恩師近藤金助先生に謹んで感謝の意を捧げる。尙ほ本研究は文部省科學研究費の補助によつて遂行し得たのである。記して以て深甚の謝意を表する。

文 獻

- (1) G. Medes: Ann. Rev. Biochem., VIII, 185 (1939)
- (2) Y. Okuda: J. Biochem. Japan, 5, 201, 217 (1925), R. Kuhn, L. Birkofer u. F. W. Quackenbush: Ber Deutsch. Chem. Ges., 72, 407 (1937)
- (3) M. X. Sullivan & W. C. Hess: J. Biol. Chem., 117, 423 (1937)
- (4) O. Folin & A. D. Marenzi: J. Biol. Chem., 83, 103 (1929)
- (5) A. E. Mirsky & M. L. Anson: J. Gen. Physiol., 18, 307 (1934-1935), 19, 427 (1935-1936)
- (6) A. Todrick & E. Walker: Biochem. J., 31, 292 (1937)
- (7) R. Kuhn u. Desnuelle: Z. physiol. Chem., 251, 14 (1938)
- (8) A. Stern, E. F. Beach & I. G. Macy: J. Biol. Chem., 130, 733 (1939)
- (9) A. E. Mirsky & M. L. Anson: J. Gen. Physiol., 18, 307 (1934-1935)
- (10) C. v. Smithe: J. Biol. Chem., 114, 601 (1936)
- (11) F. Dickens: Biochem J., 27, 1141 (1933)
- (12) L. Rosner: J. Biol. Chem., 132, 657 (1940)
- (13) E. Abderhalden u. M. Guggenheim: Ber. Deutsch. Chem. Ges., 41, 2852 (1908)
- (14) J. v. Braun: Ber. Deutsch. Chem. Ges., 41, 2130 (1908)
- (15) R. Kuhn et al (1937) 前掲
- (16) 前 掲
- (17) 近藤: 蛋白物理化學 14
- (18) A. E. Mirsky & M. L. Anson: J. Gen. Physiol., 19, 451 (1935-1936)
- (19) L. Michaelis & M. P. Schubert: J. Biol. Chem., 106, 331 (1934)
- (20) J. P. Greenstein: J. Biol. Chem., 125, 501 (1938)
- (21) 前 掲